

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009969876 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 1994-237589/199429

XRAM Acc No: C94-107990

Immobilised live Pseudomonas putida or Escherichia coli catalyst - obtd.  
by crosslinking, used for asymmetric ester hydrolysis

Patent Assignee: MITSUBISHI RAYON CO LTD (MITR )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6169772	A	19940621	JP 92323487	A	19921202	199429 B

Priority Applications (No Type Date): JP 92323487 A 19921202

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6169772	A	4	C12N-011/06	

Abstract (Basic): JP 6169772 A

Immobilised live catalyst comprises crosslinked (a) Pseudomonas putida MR-2068; or cross-linked (b) Escherichia coli Mr-2103.

The catalyst is produced by treating (a) or (b) with glutaraldehyde.

The crosslinked agent is eg. glutaraldehyde, isocyanate deriv., N,N'-ethylenebismaleimide, bisdiazobenzidine, N,N'-polymethylene bisiodoacetamide, etc.. When glutaraldehyde is used, it is pref. added at 0.5 to 5.0w.%. Cross-linking is conducted at 5-70 (60) deg. C or more to simultaneously inactivate non-heat resistant enzyme.

USE/ADVANTAGE - The catalyst is useful for asymmetric hydrolysis of carboxylic acid ester. Enzymatic activity is retained and denatured protein elution is one-third that of nontreated catalyst.

In an example, Pseudomonas putida MR-2068 was cultured in a liquid medium (pH6.8, 100ml) contg. meat essence (0.5%) peptone(0.75%), NaCl (0.25%), glucose (0.5%), and malt essence (0.15%) with stirring at 30 deg. C for one day. The culture soln. was then centrifuged, washed with ion-exchanged water, suspended in M/20 phosphate buffer, 0 or 3.0 glutaraldehyde soln. (10ml) added, heated to 60 deg. C, and stirred for one hour. The soln. contg. 16mg of immobilised bacteria was added to M/20 phosphate buffer (20ml). Protein elution dropped from 100% (no glutaraldehyde) to 32.30% when glutaraldehyde was added. Enzyme activity dropped from 100% (no glutaraldehyde) to 87.5%.

Title Terms: IMMOBILISE; LIVE; PSEUDOMONAS; PUTIDA; ESCHERICHIA; COLI; CATALYST; OBTAIN; CROSSLINK; ASYMMETRIC; ESTER; HYDROLYSIS

Derwent Class: D16; E19

International Patent Class (Main): C12N-011/06

International Patent Class (Additional): C12P-041/00; C12N-011/06;

C12R-001-40; C12R-001-19

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): D05-H04; E10-C04E; E10-E04E; E11-M

Chemical Fragment Codes (M3):

\*01\* F011 F012 F015 F019 F422 F499 H2 H212 J5 J523 L9 L930 L999 M280 M312  
M321 M332 M342 M383 M391 M413 M510 M522 M530 M540 M782 M903 M904  
N134 Q132 Q233 R11789-M  
\*02\* J4 J472 M280 M313 M321 M332 M342 M382 M391 M416 M620 M782 M903 M904  
M910 N134 Q132 Q233 R00927-M  
\*03\* G013 G019 G100 K0 K5 K533 K599 L7 L724 M1 M111 M280 M320 M414 M510

M520 M532 M540 M782 M903 M904 N134 Q132 Q233 9429-B7001-M  
\*04\* H6 H604 H608 H681 H689 J0 J012 J3 J372 M280 M311 M313 M314 M315 M316  
M321 M322 M332 M342 M349 M362 M383 M391 M392 M416 M620 M782 M903  
M904 N134 Q132 Q233 9429-B7002-M  
\*05\* G001 G002 G011 G012 G013 G014 G015 G016 G020 G021 G022 G029 G040  
G100 G221 K0 L2 L230 L299 L640 M280 M311 M312 M313 M314 M315 M316  
M320 M321 M331 M332 M333 M334 M340 M342 M383 M391 M414 M416 M510  
M520 M530 M531 M540 M620 M782 M903 M904 N134 Q132 Q233 9429-B7003-M  
\*06\* J0 J011 J1 J171 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222  
M223 M224 M225 M226 M231 M232 M233 M262 M281 M320 M416 M620 M720  
M903 M904 N134 N241 N341 N425 N442 N512 N513 Q233 R023 R90104-P  
\*07\* H4 H401 H481 H8 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222  
M223 M224 M225 M226 M231 M232 M233 M272 M281 M320 M416 M620 M720  
M903 M904 N134 N241 N362 N425 N442 N512 N513 Q233 R023 R90128-P

Derwent Registry Numbers: 0927-U

Specific Compound Numbers: R11789-M; R00927-M; R90104-P; R90128-P

Generic Compound Numbers: 9429-B7001-M; 9429-B7002-M; 9429-B7003-M

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-169772

(43) 公開日 平成6年(1994)6月21日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 11/06

// C 1 2 P 41/00

(C 1 2 N 11/06

C 1 2 R 1:40)

(C 1 2 N 11/06

D 8931-4B

審査請求 未請求 請求項の数2(全 4 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平4-323487

(22) 出願日

平成4年(1992)12月2日

(71) 出願人 000006035

三菱レイヨン株式会社

東京都中央区京橋2丁目3番19号

(72) 発明者 尾崎 英司

広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨ  
ン株式会社中央研究所内

(72) 発明者 崎前 明宏

広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨ  
ン株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 固定化生体触媒及びその製造法

(57) 【要約】

【構成】 シュードモナス プチダ (*Pseudomonas puti*  
*da*) MR-2068 株又はエセリキア コリ (*Escherichia co*  
*li*) MR-2103 株の菌体表面をグルタルアルデヒドなどで  
架橋化処理したことを特徴とする固定化生体触媒。

【効果】 酵素活性の低下が見られない。また、微生物  
菌体からのタンパク質溶出量も低減できる。このため、  
本発明の固定化生体触媒をバイオリクターによる有用  
物質の生産に用いた場合、精製工程における大幅な操作  
性の向上が期待できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) MR-2068 株又はエセリキア コリ (*Escherichia coli*) MR-2103 株の培養菌体を架橋化処理したことを特徴とする固定化生体触媒。

【請求項2】 シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) MR-2068 株又はエセリキア コリ (*Escherichia coli*) MR-2103 株の培養菌体を、グルタルアルデヒドを用いて架橋化処理することを特徴とする請求項1記載の固定化生体触媒の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、カルボン酸エステルを不斉加水分解する反応に用いる固定化生体触媒に関する。

【0002】

【従来の技術】 シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) MR-2068 株及びエセリキア コリ (*Escherichia coli*) MR-2103 株は、カルボン酸エステルを不斉加水分解し、光学純度の高い光学活性カルボン酸を生成する酵素を生産する微生物として提案されている（特開平1-222798号公報、特願平3-249923号参照）。これらの微生物が生産する酵素は耐熱性に優れており、産業上広い範囲での応用が期待されている。

【0003】 一方、固定化生体触媒応用技術は日進月歩の進歩を遂げており、目的に応じて様々な固定化方法が可能である。例えば、1) 水不溶性の担体に酵素を結合させる方法、2) 酵素を2個又はそれ以上の官能基を持った試薬で架橋する架橋法、3) 酵素を高分子ゲルの微細な格子の中に包み込むか、半透膜性の高分子の皮膜によって被覆する包括法などである。微生物、オルガネラなどの固定化についても本質的には酵素の固定化方法と同様である。

【0004】 バイオリクターにより有用物質を生産する場合、酵素反応終了液からの有用物質の精製において、溶媒抽出、再結晶、カラムクロマトグラフィーによる精製などが通常行われる。これらの工程において菌体から溶出した変性タンパク質の存在はしばしば問題となる。例えば、反応終了液から目的物を溶媒で抽出する時、エマルジョンが生成し、抽出不能となることが多々ある。これらの問題点を回避するため、タンパク質の溶出を防止した固定化生体触媒の使用が有効である場合が多い。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) MR-2068 株又はエセリキア コリ (*Escherichia coli*) MR-2103 株を用いた有用物質の生産に用いる固定化生体触媒及びその製造法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明の固定化生体触媒は、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) MR-2068 株又はエセリキア コリ (*Escherichia coli*) MR-2103 株の培養菌体を架橋化処理したことを特徴とするものである。更に、本発明の固定化生体触媒の製造法は、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) MR-2068 株又はエセリキア コリ (*Escherichia coli*) MR-2103株の培養菌体を、グルタルアルデヒドを用いて架橋化処理することを特徴とするものである。

10 【0007】 本発明に使用されるシュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) MR-2068株及びエセリキア コリ (*Escherichia coli*) MR-2103 株は、工業技術院微生物工業技術研究所に、それぞれ微工研条寄第3846号及び微工研条寄第3835号として寄託されている。本発明に使用されるシュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) MR-2068株及びエセリキア コリ (*Escherichia coli*) MR-2103 株の培養は、液体培養でも固体培養でも行うことができる。培地としては、微生物が通常資化し得る炭素源、窒素源、ビタミン、ミネラルなどの成分を適宜配合したものが用いられる。培養は、微生物が生育可能である温度及びpHで行われるが、通常50℃以下の温度で、pH2～11の範囲で行われる。微生物の生育を促進させるため、通気攪拌を行ってもよい。

20 【0008】 一方、本発明に使用できる架橋試薬は、特にその種類が限定されるものではなく、シッフ塩基をつくるグルタルアルデヒド、ペプチド結合をするイソシアヌ酸誘導体、N、N'-エチレンビスマレイミド、ジアゾカップリングをするビスジアゾベンジジン、アルキル化するN、N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミドなど

30 【0009】 本発明の固定化生体触媒の製造に用いる生体触媒の形態は、培養終了液、湿菌体、乾燥菌体（例えば凍結乾燥菌体）、噴霧乾燥菌体又は有機溶媒（例えばアセトン、トルエン等）で処理した菌体を用いることができる。製造法としては、通常の方法が適用でき、例えば、培養した菌体をpH緩衝液又は生理食塩水に懸濁し、これに架橋試薬を添加し、架橋化させて固定化生体触媒とする方法が使用可能である。

40 【0010】 架橋試薬としてグルタルアルデヒドを用いる場合、その添加量は菌体乾燥重量に対して通常0.1～10.0%（重量%）の範囲で添加することができるが、0.5～5.0%（重量%）の範囲で添加することが望ましい。架橋化処理温度は通常5～70℃の範囲で可能であるが、60℃以上の温度で処理することにより菌体の同時殺菌が可能であり、非耐熱酵素を失活させることも可能である。

50 【0011】 架橋化処理時間は通常10分から5時間の範囲で可能であるが、1時間以上処理することが望ましい。固定化生体触媒は溶液状態又は凍結乾燥などによる乾燥状態で使用可能である。このように本発明の固体化

生体触媒は調製方法が極めて簡単であり、この固定化生体触媒をバイオリクターによる有用物質生産に用いた場合、反応液中への酵素の流出を最小限に防ぐことができるため、精製工程における操作性の大幅な向上が期待できる。

【0012】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0013】

【実施例1】

(1) 固定化生体触媒の調製

シュドモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) MR-206 8 株 (微工研条寄第3846号) を肉エキス0.5%、ペプトン0.75%、NaCl 0.25%、グルコース0.5%、マルトエキス0.15%からなる液体培地 (pH6.8) 100mlに接種し、30℃で1日間振とう培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、得られた菌体の全量をイオン交換水で洗浄した後、約10mlのM/20磷酸緩衝液に懸濁した。この菌体懸濁液に菌体の乾燥重量に対して0~5.0%各濃度となるようにグルタルアルデヒド溶液を添加し、60℃に昇温後、約1時間攪拌した。得られた菌体懸濁液を固定化菌体溶液とした。

(2) 残存活性及びタンパク質溶出濃度の測定

M/20磷酸緩衝液20mlに固定化菌体16mgを含む固定化菌体溶液を添加し、カルボン酸エステルの加水分解活性を測定した。また、上清中の溶出タンパク質濃度をFolin-Lowry法で測定した。結果を表1に示す。いずれも未処理のものを100%とした。

【0014】

【表1】

表1 残存酵素活性及びタンパク質溶出量

グルタルアルデヒド 濃度 (%)	タンパク質 濃度 (%)	残存活性 (%)
0	100	100
1.0	63.5	99.0
2.0	33.5	102
3.0	32.3	87.5
4.0	30.5	55.5
5.0	27.0	35.0

【0015】

【実施例2】

(1) 固定化生体触媒の調製

エセリキア コリ (*Escherichia coli*) MR-2103 株 (微工研条寄第3835号) を肉エキス0.5%、ペプトン1.0%、NaCl 0.5%を含む液体培地 (pH7.0) 100mlに接種し、37℃で1日間振とう培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、得られた菌体の全量をイオン交換水で洗浄した後、約10mlのM/20磷酸緩衝液に懸濁した。

10 この菌体懸濁液に菌体の乾燥重量に対して0~5.0%各濃度となるようにグルタルアルデヒド溶液を添加し、60℃に昇温後、約1時間攪拌した。得られた菌体懸濁液を固定化菌体溶液とした。

(2) 残存活性及びタンパク質溶出濃度の測定

M/20磷酸緩衝液20mlに固定化菌体16mgを含む固定化菌体溶液を添加し、カルボン酸エステルの加水分解活性を測定した。また、上清中の溶出タンパク質濃度をFolin-Lowry法で測定した。結果を表2に示す。いずれも未処理のものを100%とした。

20 【0016】

【表2】

表2 残存酵素活性及びタンパク質溶出量

グルタルアルデヒド 濃度 (%)	タンパク質 濃度 (%)	残存活性 (%)
0	100	100
1.0	58.7	106
2.0	28.3	110
3.0	28.3	85.5
4.0	32.6	60.0
5.0	26.1	28.5

【0017】

【発明の効果】本発明の固定化生体触媒は、菌体表面を架橋処理されているため、酵素活性の低下が見られない。また、微生物菌体からのタンパク質溶出量も未処理のものに比較して1/3以下に低減することが可能である。このため、本発明の固定化生体触媒をバイオリクターによる有用物質の生産に用いた場合、精製工程における大幅な操作性の向上が期待できる。

40

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>5</sup>

C12R 1:19)

(C12P 41/00

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(4)

特開平6-169772

C 1 2 R 1:40)  
(C 1 2 P 41/00  
C 1 2 R 1:19)